



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 00 626 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
G 01 N 35/10
G 01 N 33/561
G 01 N 30/00
C 12 Q 1/68
// G01N 27/447

⑳ Aktenzeichen: 197 00 626.4
㉔ Anmeldetag: 10. 1. 97
㉕ Offenlegungstag: 16. 7. 98

DE 197 00 626 A 1

㉑ **Anmelder:**
Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie
(EMBL), 69117 Heidelberg, DE

㉒ **Vertreter:**
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

㉓ **Erfinder:**
Ansorge, Wilhelm, 69251 Gaiberg, DE; Erfle, Holger,
69207 Sandhausen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ **Probenzuführung**
⑤⑦ Beim Verfahren zur Zuführung von Probenmaterial mittels eines Probenzuführteils von einer Probenzugabestelle zu einer Probenannahmestelle einer Probenbearbeitungseinrichtung wird vorgeschlagen, daß das Probenzuführteil wenigstens einen Materialabschnitt aus porösem Material aufweist mit einer derartigen Porengröße des porösen Materials, daß das Probenmaterial zumindest bei der Probenzugabe in das Probenzuführteil und bei der Probenannahme durch die Probenbearbeitungseinrichtung im porösen Material in flüssiger Phase aufgrund von Kapillarkräften gehalten wird.

DE 197 00 626 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Zuführung von Probenmaterial mittels eines Probenzuführteils von einer Probenzugabestelle zu einer Probenannahmestelle einer Probenbearbeitungseinrichtung, vorzugsweise Probenanalyseinrichtung.

Bei einem bekannten Verfahren wird das Probenmaterial mit Hilfe einer Pipettiereinrichtung von einer Probengefäßeinheit entnommen und der Probenbearbeitungseinrichtung in Form einer vertikal orientierten Elektrophoreseeinrichtung zugeführt (DE 38 05 808 A1, Fig. 10 und 11). Es können auch mehrere Proben gleichzeitig mit Hilfe einer entsprechenden Vielzahl von Pipetten aufgenommen und entsprechenden Probenaufnahmetaschen am oberen Gelrand zugeführt werden. Der mechanische Aufwand für diese bekannte Art der Probenzuführung ist groß, zumal dann, wenn besonders dünne Gelschichten eingesetzt werden, und eine hohe Anzahl von Proben gleichzeitig analysiert werden soll. Der der Geldicke entsprechende Spalt zwischen den Glasplatten beidseits des Gels liegt bei den heutzutage angestrebten geringen Geldicken im Bereich unter einem Millimeter; der Abstand zwischen aufeinanderfolgenden Probentaschen liegt im Bereich weniger Millimeter. Je nach Breite des Gels können dann bis zu 100 Probenausschnitte nebeneinander angeordnet sein. Der Aufwand für die entsprechende Vielzahl an Pipetten ist dementsprechend hoch sowie die Anforderungen an die Positioniergenauigkeit. Es kommt praktisch nur eine vertikale Orientierung des Gels in Frage, da ansonsten die Probenausschnitte auslaufen könnten.

Aus der WO 94/11529 ist ein Verfahren der eingangs genannten Art bekannt. An den Zähnen des kammartigen Probenzuführteils ist das Probenmaterial spezifisch chemisch gebunden. Nach dem Heranführen des Probenzuführteils an das Elektrophoresegel wird die spezifische chemische Bindung durch Zugabe eines entsprechenden Mittels (Formamid) gelöst, so daß dann das Probenmaterial sich vom Probenzuführteil lösen kann und in das Gel unter der Einwirkung des elektrischen Feldes eindringen kann. Das kammartige Probenzuführteil weist lediglich acht Zähne auf, so daß dementsprechend nur acht Proben gleichzeitig analysiert werden können. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß nur bei relativ breiten Zähnen ausreichend Probenmaterial bereitgestellt werden kann.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren der genannten Art bereitzustellen, welches in einfacher Weise eine effektive Probenmaterialzuführung erlaubt.

Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß das Probenzuführteil wenigstens einen Materialabschnitt aus porösem Material aufweist mit einer derartigen Porengröße des porösen Materials, daß das Probenmaterial zumindest bei der Probenzugabe in das Probenzuführteil und bei der Probenannahme durch die Probenbearbeitungseinrichtung im porösen Material in flüssiger Phase aufgrund von Kapillarkräften gehalten wird. Das Probenmaterial wird also, zumindest bei der Probenzugabe bzw. Probenabgabe, in flüssiger Phase lediglich aufgrund von Kapillarkräften im Probenmaterial gehalten. Zwischenzeitlich kann, jedoch muß nicht, das Probenmaterial in getrockneter Form in den Poren des porösen Materials vorliegen. Jedenfalls erspart man sich komplizierte Mechaniken, wie Multi-Pipettiereinrichtungen. Auch muß zur Probenzugabe das poröse Material lediglich mit dem in flüssiger Phase vorliegenden Probenmaterial in Kontakt gebracht werden; Reaktionen zur chemischen Bindung des Probenmaterials am Probenzuführteil sind keineswegs erforderlich, ebenso wenig wie chemische Reaktionen bei der Probenabgabe zum Lösen der chemischen Bindung zwi-

schen Probenmaterial vom Probenzuführteil. Da die Kapillarkräfte das Probenmaterial in der flüssigen Phase bei der Probenabgabe bis zum Übertritt in die Probenbearbeitungseinrichtung, unabhängig von der Schwerkraftrichtung halten, besteht auch keine Einschränkung mehr in Bezug auf die Orientierung der Probenbearbeitungseinrichtung. Das poröse Material kann Blattform aufweisen, so daß es problemlos zwischen die Glasplatten einer Gelelektrophoreseeinrichtung geschoben werden kann. Zumindest der Materialabschnitt des Probenzuführteils besteht vorzugsweise durchgehend aus porösem Material, so daß das Fassungsvermögen des Materialabschnitts für das Probenmaterial vergleichsweise hoch ist. Es genügen daher kleinformatige Materialabschnitte, so daß eine entsprechende Vielzahl von Materialabschnitten auf geringem Raume eingesetzt werden können. Die Anzahl der gleichzeitig zu analysierenden Proben bei vorgegebener Breite des Elektrophoresegels läßt sich daher deutlich steigern, beispielsweise auf 192 bis 384 Proben.

In Weiterbildung der Erfindung wird vorgeschlagen, daß man das Probenmaterial nach Probenzugabe in das Probenzuführteil trocknet und daß man das Probenzuführteil vor der Probenabgabe einer flüssigen Phase zuführt. Das zwischenzeitlich trockene Probenzuführteil kann besonders leicht gehandhabt werden; die Gefahr zwischenzeitlicher Kontamination ist wesentlich reduziert.

Um eine Probenabgabe vom Probenzuführteil an die Probenbearbeitungseinrichtung zu erzwingen, kann das Probenzuführteil beispielsweise mechanisch bearbeitet werden, z. B. mechanisch zusammengedrückt werden oder von Druckgas durchblasen werden. Besonders bevorzugt ist es jedoch, wenn man im Bereich der Probenannahmestelle einen porösen Materialabschnitt durchsetzendes elektrisches Feld erzeugt, um einen Fluß elektrisch geladener Moleküle, Makromoleküle oder Teilchen des Probenmaterials vom porösen Materialabschnitt in die Probenbearbeitungseinrichtung zu bewirken. Die Stärke des elektrischen Feldes wird in Abhängigkeit von der elektrischen Ladung so gewählt, daß die Kapillarkräfte überwunden werden. Besonders vorteilhaft ist die Anwendung dieses Verfahrensschritts bei der Elektrophorese, da dort von vornherein die Mittel zur Erzeugung des elektrischen Feldes vorgesehen sind.

Da, wie angesprochen, das mit dem Probenmaterial beladene Probenzuführteil einfach handhabbar ist, ergibt sich die vorteilhafte Möglichkeit, daß man nach der Zugabe der Probe das Probenzuführteil von der Probenzugabestelle zur Probenannahmestelle transportiert. Die Zugabe der Probe kann also an einem beliebigen von der Probenbearbeitungseinrichtung entfernten Ort vor sich gehen.

Alternativ hierzu kann der Transport der Probe von der Probenzugabestelle zur Probenannahmestelle auch dadurch erfolgen, daß bei körperlicher Verbindung der Probenzugabestelle mit der Probenannahmestelle durch den porösen Materialabschnitt des Probenzuführteils die Kapillarkräfte für den Probentransport sorgen. Diese Art der Probenzuführung wird man vor allem dann einsetzen, wenn die Probenannahmestelle besonders unzugänglich liegt oder sich auf einen sehr kleinen Raum beschränkt, wie dies bei Mikrochipsensoren, insbesondere DNA-Sensoren, der Fall sein kann. In einem solchen Falle wird man in der Regel für jede Probe einen gesonderten Materialabschnitt einsetzen, der von den Materialabschnitten der übrigen Proben unabhängig ist, um ein "Übersprechen", d. h. ein Mischen von Probenmaterial, von vornherein zu verhindern, was ansonsten aufgrund der vergleichsweise großen Mengen an einzusetzendem Probenmaterial möglich wäre.

Man kann die Möglichkeit des Mischens jedoch auch gezielt ausnutzen, indem man das poröse Material an verschie-

denen Stellen oder nacheinander an der gleichen Stelle mit den zu vermischenden Substanzen benetzt. So kann man durch entsprechende Zugabe im porösen Material Proteine (z. B. Antigene) mit Antikörpern mischen oder DNA mit komplementärer Hybridisierungs-DNA oder DNA mit Labeling-Mitteln.

Bei der zuerst angesprochenen Alternative mit körperlichem Transport des Probenzuführteils von Probenzugabestelle zur Probenannahmestelle kann mit wesentlich geringeren Mengen an Probenmaterial gearbeitet werden, so daß die Gefahr des Übersprechens auch bei miteinander in Verbindung stehenden Materialabschnitten im allgemeinen zu vernachlässigen ist.

Aufgrund der angesprochenen einfachen Handhabbarkeit sowie der relativ hohen Probenmaterialkapazität der porösen Materialabschnitte besteht die bevorzugte Möglichkeit, daß man bei einer Probenbearbeitungseinrichtung mit einer Vielzahl von Probenannahmestellen eine entsprechende Vielzahl poröser Materialabschnitte einsetzt.

Es können, wie erwähnt, jeweils für sich gesonderte Materialabschnitte eingesetzt werden mit dem Vorzug strikter Trennung, ohne die Gefahr eines Übersprechens. Herstellung und Handhabung der Materialabschnitte vereinfacht sich jedoch dann wesentlich, wenn das Probenzuführteil erfindungsgemäß einen Materialabschnittsträger umfaßt, welcher die Materialabschnitte in einer der geometrischen Anordnung der Probenannahmestellen entsprechenden Anordnung trägt. Dabei kann das Probenzuführteil im wesentlichen kammartig geformt sein, wenn die Probenannahmestellen linear oder bogenförmig angeordnet sind.

Besonders einfach läßt sich das Probenzuführteil herstellen, beispielsweise durch Stanzen, wenn dieses ein sämtliche poröse Materialabschnitte aufweisendes Blatt aus porösem Material umfaßt.

Der Materialabschnittsträger kann jedoch auch eine entsprechende Vielzahl voneinander gesonderter Materialabschnitte tragen. Eine derartige Anordnung empfiehlt sich dann, wenn die Gefahr eines Übersprechens ansonsten nicht auszuschließen ist.

Der Materialabschnittsträger kann von einer Unterlagsfolie gebildet sein, oder auch andere Form annehmen, wie beispielsweise die einer Klemmvorrichtung.

Bevorzugt wird ein poröses Material mit einer mittleren Porengröße unter 100 µm, vorzugsweise unter 10 µm, am besten unter 1 µm, eingesetzt bzw. mit einer mittleren Porengröße zwischen 1,5 µm und 0,2 µm, am besten bei etwa 0,5 µm. Derartiges poröses Material weist für die üblicherweise eingesetzten Probenmaterialien, insbesondere im biochemischen Bereich, ausreichend hoher Kapillarkräfte auf.

Als besonders geeignet hat sich poröses Material aus porösem Celluloseacetat oder porösem Polyethylen oder porösem Glas oder Agarosegel oder anderen weitmaschigen Gel-Matrizen herausgestellt.

Die Probenannahme des Probenmaterials durch die Probenbearbeitungseinrichtung unter Einwirkung des genannten elektrischen Feldes setzt eine elektrische Ladung der zu bewegenden Substanzen voraus. Diese Ladung kann bei biologischen Makromolekülen in gewünschter Weise erhalten werden, indem man den pH-Wert der flüssigen Phase in entsprechender Weise einstellt.

Es hat sich herausgestellt, daß unter dem elektrischen Feld praktisch das gesamte Probenmaterial vom Probenzuführteil abgegeben und der Probenbearbeitungseinrichtung zugeführt wird. Dies eröffnet die Möglichkeit, daß man das Probenzuführteil mehrmals hintereinander zur Zuführung von Probenflüssigkeit einsetzt. Der Aufwand für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird hierdurch wiederum reduziert.

Um die Beladung des Probenzuführteils mit einer Vielzahl von Proben zu erleichtern, wird vorgeschlagen, daß man eine Probengefäßeinheit einsetzt mit einer Vielzahl von Probenaufnahmen in einer der geometrischen Anordnung der Materialabschnitte des Probenzuführteils entsprechenden geometrischen Anordnung. Es genügt daher, wenn man das beispielsweise kammartige Probenzuführteil mit allen Kammzähnen gleichzeitig in die Vielzahl von Probenaufnahmen eintaucht.

Das beschriebene Verfahren kann für eine Vielzahl von Probenbearbeitungseinrichtungen, insbesondere zum Nachweis und/oder zur Herstellung eines biochemischen Reaktionsprodukts eingesetzt werden. Ein weiteres Anwendungsbeispiel ist ein Massenspektrometer. Besonders bevorzugt ist der Einsatz für die Zuführung von Probenflüssigkeit für eine Elektrophoreseeinrichtung oder eine Chromatographieeinrichtung.

Dabei kann das Trennmittel, vorzugsweise Trenngel, der Elektrophoreseeinrichtung nicht nur, wie bisher, vertikal orientiert sein, sondern auch horizontal oder in beliebiger Raumorientierung.

Weiter wird vorgeschlagen, daß man eine flüssige Phase, vorzugsweise Pufferlösung, in einen Bereich an einem Zugabeende eines Trennmittels der Elektrophoreseeinrichtung bzw. Chromatographieeinrichtung zugibt und zwar vor oder nach dem Heranführen des Probenzuführteils. Im Falle eines zwischenzeitlich getrockneten Probenzuführteils dient die flüssige Phase dazu, das in den Poren reversibel adsorbierte Probenmaterial innerhalb der Poren zu lösen. Die dann auftretenden Kapillarkräfte halten das Probenmaterial in den Poren solange keine äußeren Kräfte angreifen, wie die elektrischen Feldkräfte der Elektrophoreseeinrichtung. Durch die Zugabe der flüssigen Phase, insbesondere Pufferlösung, läßt sich somit der früheste Beginn der Probenmaterialwanderung festlegen; dies gilt auch dann, wenn das Probenmaterial nicht zwischenzeitlich getrocknet wurde.

Aufgrund der Einwirkung des elektrischen Feldes ist ein unmittelbarer Übergang des Probenmaterials in das Trennmittel möglich; aufgrund der Anwesenheit der flüssigen Phase, vorzugsweise Pufferlösung, kann zwischen dem Probenzuführteil und dem Zugabeende des Trennmittels jedoch auch ein Abstand bis zu mehreren Millimetern bestehen.

Ferner wird vorgeschlagen, daß bei einem zur gleichzeitigen Trennung mehrerer Probenflüssigkeiten geeigneten Trennmittel mit mehreren Probenflüssigkeit-Zugabestellen längs einer Trennmittelkante die Probenflüssigkeit-Zugabestellen im Trennmittel Probenflüssigkeit-Ausnehmungen ausbilden zur Aufnahme entsprechender poröser Materialabschnitte des Probenzuführteils. Die Probenflüssigkeit-Ausnehmungen können hierbei unabhängig vom Probenzuführteil und vor dem Zuführen des Probenzuführteils hergestellt werden oder, alternativ, durch Einsetzen des bereits mit Probenmaterial versehenen kammförmigen Probenzuführteils in das Trenngelmaterial vor dessen Polymerisierung.

Durch die Probenflüssigkeit-Ausnehmungen wird ein Vermischen von verschiedenen Proben an der Trennmittelkante von vornherein vermieden.

Es hat sich jedoch herausgestellt, daß es auch möglich ist, bei einem zur gleichzeitigen Trennung mehrerer Probenflüssigkeiten geeigneten Trennmittel mit mehreren Probenzugabestellen längs der Trennmittelkante das Probenzuführteil mit seinen voneinander in Richtung der Trennmittelkante beabstandeten Materialabschnitten in Kontakt mit der Trennmittelkante zu bringen oder in einem bis zu einige Millimeter betragenden Abstand von der Kante anzuordnen. In diesem Falle sind also keine Probenflüssigkeit-Ausnehmungen ausgebildet, so daß das Trennmittel durchgehend

längs der geraden oder bogenförmigen Trennmittelkante endet. Dies erleichtert die Herstellung des Trennmittels. Darüber hinaus hat sich herausgestellt, daß durch den Wegfall der Gelmaterialestege zwischen den Ausnehmungen die lineare Probendichte (parallel zur Trennmittelkante) weiter erhöht werden kann, ohne Beeinträchtigung der Messung, insbesondere ohne die Gefahr der Probenvermischung. Auch ergeben sich präzise, parallel zueinander verlaufende Elektrophorese-Spuren, die eine genaue vergleichende Auswertung benachbarter Spuren ermöglichen, zumal der Elektrophoresebeginn jeder Spur erfindungsgemäß genau gleichzeitig ausgelöst werden kann. Die Ursache für diese entscheidenden Vorteile mag darin liegen, daß erfindungsgemäß der Austritt von Probenmaterial aus dem Probenzuführteil und damit der Eintritt in das Elektrophoresegeß schließlich durch das elektrische Feld ausgelöst wird mit erzwungener Wanderung der geladenen Teilchen in Feldrichtung. Eine anderweitige Bewegung, insbesondere Diffusionsbewegung in Querrichtung, wird von vornherein unterbunden.

Die beschriebenen Vorteile der Erfindung kommen wenigstens zum Teil auch dann zum Tragen, wenn sie zur Zuführung von Probenflüssigkeit zu einer mehrere Trennkapillaren aufweisenden Elektrophoreseeinrichtung oder Chromatographieeinrichtung eingesetzt wird. Auch hier ist eine hohe Probendichte bei einfacher Handhabung realisierbar.

Das Verfahren kann auch, wie bereits angesprochen, zur Zuführung von Probenflüssigkeit zu einer Mikrochipanordnung eingesetzt werden, wobei dann das Probenzuführteil bzw. mehrere Probenzuführteile in Form gesonderter Materialabschnitte auch ortsfest sein können, um unzugängliche Sensorbereiche mit Abmessungen, beispielsweise von $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ mit besser zugänglichen Zugabestellen dauernd zu verbinden.

Die Erfindung betrifft auch ein Probenzuführteil zur Durchführung des geschilderten Verfahrens mit wenigstens einem Materialabschnitt aus entsprechend porösem Material.

Die Erfindung betrifft auch eine Elektrophoreseeinrichtung mit Probenzuführteil zur Durchführung des genannten Verfahrens, wobei, wie ebenfalls bereits erwähnt, neben der bisher vertikalen Anordnung auch eine horizontale Anordnung bzw. eine beliebige Anordnung des Trenngels möglich ist.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchführung einer Reaktion zwischen mindestens einem ersten und mindestens einem zweiten Reaktionspartner, vorzugsweise zum Nachweis oder/und zur Herstellung eines biochemischen Reaktionsprodukts in einer Probenflüssigkeit, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man mindestens einen ersten Reaktionspartner, der auf einem porösen Material reversibel adsorbiert ist, in einer flüssigen Phase in Kontakt mit mindestens einem zweiten Reaktionspartner bringt, wobei die Porengröße des porösen Materials derart ist, daß die flüssige Phase zumindest teilweise im porösen Material aufgrund von Kapillarkräften gehalten wird.

Die Reaktion im eben beschriebenen Verfahren ist vorzugsweise eine biochemische Reaktion, d. h. eine Reaktion, an der biologische Makromoleküle, wie etwa Proteine, Glykoproteine oder/und Nukleinsäuren bzw. Komplexe solcher Makromoleküle, z. B. Immunkomplexe zwischen Antikörpern und Antigenen, Protein-Nukleinsäure-Komplexe oder Nukleinsäure-Hybridisierungskomplexe als Reaktionspartner beteiligt sind bzw. als Reaktionsprodukte entstehen. Besonders geeignet ist das Verfahren für eine Reaktion an Nukleinsäuren, z. B. eine in vitro-Transkription, eine Nukleinsäuresequenzierung oder eine Nukleinsäureamplifizierung.

Bei dem eben beschriebenen Verfahren wird ein erster

Reaktionspartner verwendet, der auf einem porösen Material mit geeigneter Porengröße reversibel adsorbiert ist, d. h. die Adsorption auf dem porösen Material erfolgt nicht über chemische kovalente Bindungen oder hochaffine Wechselwirkungen (z. B. Biotin-Streptavidin), so daß eine Elution des ersten Reaktionspartners oder/und der Reaktionsprodukte aus dem porösen Material unter geeigneten Bedingungen im wesentlichen vollständig gelingt.

An das poröse Material können auch mehrere erste Reaktionspartner adsorbiert sein. Dies kann beispielsweise durch Tränken des Materials mit einer gleichzeitig mehrere Reaktionspartner enthaltenden Flüssigkeit bzw. durch aufeinanderfolgendes oder an verschiedenen Stellen des porösen Materials erfolgendes Tränken des Materials mit mehreren Flüssigkeiten erfolgen.

Für das erfindungsgemäße Verfahren kann das poröse Material so eingesetzt werden, daß der erste Reaktionspartner entweder trocken oder feucht auf dem porösen Material adsorbiert ist. Um die Haltbarkeit des adsorbierten Reaktionspartners zu verbessern bzw. das Reaktionsvolumen zu verringern, ist die trockene Adsorption bevorzugt. Die Trocknung des porösen Materials kann auf übliche Weise, z. B. durch Gefriertrocknen oder Vakuumtrocknen, erfolgen.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens handelt es sich bei der durchgeführten Reaktion um eine Nachweisreaktion zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe biologischen Ursprungs, z. B. einer Probe, die eine Körperflüssigkeit umfaßt, wie etwa Serum, Blut, Plasma, Urin, Speichel etc. Ebenso können jedoch auch andere biologische Proben, z. B. Gewebeproben, verwendet werden.

Bei der Nachweisreaktion zur Bestimmung eines Analyten handelt es sich bei dem ersten, auf dem porösen Material reversibel adsorbierten Reaktionspartner, vorzugsweise um eine mit dem zu bestimmenden Analyten spezifisch bindfähige Substanz oder um eine mit dem Analyten um einen weiteren Bindepartner konkurrierende Substanz. Wenn es sich bei dem Analyten beispielsweise um ein immunchemisch nachweisbares Antigen handelt, kann der erste Reaktionspartner ein mit dem Analyten bindfähiger Antikörper oder ein Analyt-Analogon sein, welches mit dem Analyten um die Bindung an einen Antikörper konkurrieren kann. Wenn es sich bei dem Analyten beispielsweise um eine Nukleinsäure handelt, kann der erste Reaktionspartner eine zu dem Analyten komplementäre Nukleinsäure bzw. ein entsprechendes Nukleinsäure-Analogon (z. B. eine peptidische Nukleinsäure) sein.

Für Nachweisverfahren ist es zweckmäßig, daß bei der Reaktion eine Markierungsgruppe vorhanden ist, die das Auftreten oder/und die Stärke der Reaktion anzeigt und somit eine qualitative bzw. quantitative Bestimmung des Analyten ermöglicht. Vorzugsweise ist die Markierungsgruppe eine nicht radioaktive Markierungsgruppe, z. B. eine fluoreszierende oder lumineszierende Gruppe, ein Enzym, ein Metallpartikel, eine NMR-aktive Gruppe oder eine andere, dem Fachmann auf dem Gebiet biochemischer Nachweisverfahren geläufige Markierungsgruppe.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Reaktion so durchgeführt, daß die Reaktionsprodukte im wesentlichen vollständig in den Poren gehalten werden. Weiterhin ist es bevorzugt, daß die Reaktionsprodukte im wesentlichen vollständig wieder aus dem porösen Material entfernbar sind. Auf diese Weise ist eine quantitative Bestimmung der Reaktion möglich.

Die das Reaktionsprodukt enthaltende Probenflüssigkeit kann – wie zuvor beschrieben – einer Probenbearbeitungseinrichtung, vorzugsweise einer Probenanalyseeinrichtung,

zugeführt werden.

Ein weiterer Vorteil bei der Durchführung einer erfindungsgemäßen Reaktion in den Poren eines porösen Materials besteht darin, daß nach Ablauf der gewünschten Reaktionsdauer kein nichtwäßriges Stop- oder Denaturierungsreagenz, z. B. Formamid, zugegeben werden muß. Bei Verfahren des Standes der Technik, insbesondere bei Reaktionen an Nukleinsäuren, ist die Zugabe eines solchen Formamid-Reagenz erforderlich, um eine ausreichende Denaturierung der in der Probe vorhandenen Nukleinsäuren zu erreichen. Überraschenderweise wurde festgestellt, daß beim erfindungsgemäßen Verfahren auf diese Formamid-Zugabe verzichtet werden kann.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenz zur Durchführung einer Reaktion, insbesondere zum Nachweis oder/und zur Herstellung eines biochemischen Reaktionsprodukts, welches ein Teil mit wenigstens einem Materialabschnitt aus porösem Material umfaßt, wobei mindestens eine reaktive Substanz auf dem porösen Material reversibel adsorbiert ist und wobei die Porengröße des porösen Materials derart ist, daß die reaktive Substanz bei Kontakt mit Flüssigkeit zumindest teilweise im porösen Material aufgrund von Kapillarkräften gehalten wird. Dieses erfindungsgemäße Reagenz kann neben anderen Testkomponenten als Bestandteil eines Reagenzienkits eingesetzt werden.

Die Erfindung wird im folgenden an bevorzugten Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnungen erläutert. Es zeigt:

Fig. 1 eine entlang der Schnittlinie I-I in Fig. 2 teilweise geschnittene Draufsicht einer ersten Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Elektrophoreseeinrichtung mit kammartigem Probenzuführteil,

Fig. 2 eine entlang der Schnittlinie II-II in Fig. 1 geschnittene Seitenansicht der Elektrophoreseeinrichtung gemäß Fig. 1,

Fig. 3 eine analog zur Fig. 1 geschnittene Draufsicht einer zweiten Ausführungsform mit glattkonturigem Gel-Formkörper,

Fig. 4 eine entlang der Schnittlinie IV-IV in Fig. 5 teilweise geschnittene Draufsicht der Elektrophoreseeinrichtung, jedoch mit abgewandeltem Probenzuführteil,

Fig. 5 eine entlang der Schnittlinie V-V in Fig. 4 geschnittene Seitenansicht der Ausführungsform gemäß Fig. 4,

Fig. 6 eine entlang der Linie VI-VI geschnittene Draufsicht einer mehrere Trennkapillaren aufweisenden dritten Ausführungsform der Elektrophoreseeinrichtung mit entsprechendem Probenzuführteil,

Fig. 7 eine entlang der Linie VII-VII geschnittene Schnittansicht der Anordnung gemäß Fig. 6,

Fig. 8 eine geschnittene Vorderansicht eines in die Probenaufnahmen einer Probengefäßeinheit eingesetzten, kammartigen Probenzuführteils,

Fig. 9 die die Verwendung des Probenzuführteils kennzeichnenden Verfahrensschritte,

Fig. 10 eine Verwendungsmöglichkeit separater Probenzuführteilabschnitte zum Zuführen von Probenflüssigkeit zu einer kreisförmig angeordneten, DNA-Sensoren aufweisenden Mikrochipanordnung, und

Fig. 11 eine vereinfachte isometrische Ansicht einer weiter abgewandelten Elektrophoreseeinrichtung mit Probenzuführteil.

Die in den Fig. 1 und 2 gezeigte erste Ausführungsform der erfindungsgemäßen Probenbearbeitungseinrichtung in Form einer Elektrophoreseeinrichtung ist allgemein mit 10 bezeichnet. Sie umfaßt eine erste Glasplatte 12 und eine zu dieser parallel angeordnete zweite Glasplatte 14, die durch zwei seitlich angeordnete Abstandshalter, im folgenden auch Spacer 16 genannt, in einem definierten Abstand zur ersten Glasplatte 14 gehalten wird. Der sich ergebende

Hohlraum zwischen den beiden Glasplatten 12 und 14 und den Spacern 16 ist durch eine Schicht 18 polymerisierten Gels ausgefüllt. Es können verschiedene Gele zum Einsatz kommen, wie z. B. Polyacrylamid-Gele, Agarose-Gele oder Hydroxyethylcellulose-Gele. An einer der beiden Stirnflächen weist die Gelschicht 18 eine kammartige Struktur auf, die sich aus einer Vielzahl von Vertiefungen, sogenannten Probenannahmestellen 20, und zwischen den Vertiefungen liegenden Gelwänden 22 zusammensetzt.

Diese Struktur wird bekanntermaßen dadurch hergestellt (DE-C2-30 24 288), daß an der entsprechenden Stelle in das noch nicht polymerisierte Gel ein kammartiger Formkörper aus gelabweisendem Material zwischen die beiden Glasplatten 12 und 14 der Gelschicht 18 und zwischen den beiden Spacern 16 eingedrückt wird und dort solange verbleibt, bis das Gel polymerisiert ist. Beim vorsichtigen Entfernen des kammartigen Formkörpers entsteht dann die erwünschte kammartige Struktur der Gelstirnfläche. Unter kammartiger Struktur sei hier verstanden, daß die Kontur der Gelstirnfläche in der Draufsicht gemäß Fig. 1 eine lineare Aufeinanderfolge von Rechteckzähnen bildet.

In die Probenannahmestellen 20 der Gelschicht 18 sind hervorstehende Abschnitte 24 eines kammartigen Probenzuführteils 26 eingefügt. Wie in Fig. 2 zu erkennen ist, steht im Stirnbereich der Elektrophoreseeinrichtung 10 die erste Glasplatte 12 deutlich über die zweite Glasplatte 14 vor. Dies erleichtert das Einführen der vorstehenden Abschnitte 24 des Probenzuführteils 26 in die dafür im Gel vorgesehene Probenannahmestellen 24.

Das Probenzuführteil 26 weist eine Dicke D auf, die kleiner als die der Gelschicht 18 (im Bereich zwischen 0,1 mm und 0,3 mm) ist. Die Länge L der Abschnitte ("Zähne") 24 beträgt etwa 3 mm bis 8 mm und ihre Breite B etwa 1 mm (im wesentlichen entsprechend der Tiefe und Breite der Probenannahmestellen 20). Der lichte Abstand A zwischen aufeinander folgenden Abschnitten 29 beträgt im allgemeinen 1 mm bis 3 mm entsprechend der Dicke der Gelwände 22.

Das Probenzuführteil 26 besteht aus porösem Material, wie z. B. porösem Celluloseacetat (mit D = 0,15 mm bis 0,2 mm), porösem Polyethylen oder porösem Glas, dessen Porengröße derart ausgebildet ist, daß es bei Kontakt mit Probenflüssigkeit diese aufgrund von Kapillarkräften aufnimmt und hält. Bevorzugt werden Porengrößen im Bereich von 0,5 µm eingesetzt. Es können unter Umständen aber auch Materialien mit größeren oder kleineren Poren verwendet werden. Aufgrund der Kapillarkräfte wird dann die aufgenommene Probenflüssigkeit in den Poren des porösen Materials des Probenzuführteils 26 gehalten, solange keine die Kapillarkräfte überwindende Kraft auf die Probenflüssigkeit wirkt.

Durch Anlegen des üblichen elektrischen Feldes an die Elektrophoreseeinrichtung 10 wird auf die elektrisch geladenen Bestandteile der Probenflüssigkeit in den Poren des porösen Materials des Probenzuführteils 26 eine die Kapillarkräfte übersteigende Kraft ausgeübt mit der Folge, daß diese Bestandteile das Probenzuführteil 26 verlassen und in die Gelschicht 18 eindringen und dort entlang der üblichen, zueinander parallelen Bahnen 19 wandern mit zunehmender örtlicher Trennung entsprechend der jeweiligen Ladung und Beweglichkeit im Gel. Auf die Handhabung des Probenzuführteils 26 wird später in Verbindung mit Fig. 9 noch näher eingegangen.

Abweichend zum vorstehend Beschriebenen können die Probenannahmestellen 20 in Form der Vielzahl von Vertiefungen mit zwischen den Vertiefungen liegenden Gelwänden 22 auch dadurch hergestellt werden, daß anstelle des kammartigen Formkörpers aus gelabweisendem Material das Probenzuführteil 26 selbst bei der Gelherstellung zwisch-

schen die Glasplatten 12 und 14 eingesetzt wird. Dabei wird man im allgemeinen ein bereits mit Probenmaterial getränktes Probenzuführteil 26 einsetzen oder ein Probenzuführteil, welches nach dem Tränken mit den verschiedenen Proben getrocknet worden ist. Bei entsprechender Gestaltung des Probenzuführteils 26, beispielsweise ähnlich der noch zu beschreibenden Fig. 4 und 5, mit voneinander getrennten Materialabschnitten kann auch ein probenmaterialfreies Probenzuführteil in das Gelmaterial eingesetzt werden, wobei dann nach der Fertigstellung des Gels durch Polymerisation vor der eigentlichen Messung Probenmaterial jeweils in den Bereich der einzelnen Materialabschnitte 24 gebracht wird, beispielsweise durch Zuführung mittels Pipette. Der Materialtransport des Probenmaterials in den Bereich des Gels erfolgt in diesem Fall allein durch die Kapillarkräfte. Eine nach diesem Prinzip arbeitende Anordnung wird nachfolgend noch anhand der Fig. 10 erläutert.

Fig. 3 zeigt eine Elektrophoreseeinrichtung, die im wesentlichen denselben Aufbau, wie die gemäß Fig. 1, besitzt.

Bei der Ausführungsform gemäß Fig. 3 weist allerdings die Stirnfläche der Gelschicht 28 statt einer kammartigen Struktur eine lineare Kontur auf. Diese lineare Kontur wird dadurch hergestellt, daß ein geeigneter Formkörper 30 mit sich längs einer Geraden erstreckenden ebenen oder auch gewölbten Stirnflächen 32 zwischen die beiden Glasplatten 12 und 14 in das noch nicht polymerisierte Gel eingedrückt wird und dort verbleibt, bis das Gel polymerisiert ist. Nach dem Entfernen des Formkörpers 30 kann dann das kammartige Probenzuführteil 26 zugeführt werden, welches in seiner Form demgemäß Fig. 1 und 2 entsprechen kann. Unter Umständen kann der lichte Abstand A zwischen aufeinander folgenden Abschnitten 24 reduziert werden, da nicht mehr auf die ausreichende Stabilität der entsprechenden Gelwände 22, wie beim Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 1 und 2 Rücksicht genommen werden muß. Somit läßt sich eine größere Anzahl von Spuren 19 verwirklichen, so daß eine größere Anzahl von Proben gleichzeitig gemessen werden kann. Dennoch wird nach dem Einsetzen des Probenzuführteils 26 ein Vermischen von Probenflüssigkeit benachbarter Kammabschnitte 24 verhindert, da die Kapillarkräfte in den Abschnitten 24 ein seitliches Austreten der Probenflüssigkeit im allgemeinen verhindern. Erst durch Anlegen des elektrischen Feldes wird erreicht, daß die Probenflüssigkeit in Richtung des Feldes (parallel zur Längsrichtung der Spuren 19) austritt, also nicht in Querrichtung zu den benachbarten Kammabschnitten 24. Zusätzlich kann man mit der Zugabe von Elektrolytflüssigkeit in den Bereich des eingeführten Probenzuführteils 26 bis unmittelbar vor Aufbau des elektrischen Feldes warten, so daß ein vorheriges laterales Wandern von Probenflüssigkeit zwischen benachbarten Kammabschnitten 24 ausgeschlossen ist.

Eine weitere, mit 26' bezeichnete Ausführungsform ist in den Fig. 4 und 5 dargestellt. Hierbei werden eine Vielzahl gesonderter Probenzuführ-Materialabschnitte 34 durch einen Materialabschnittsträger 36 gehalten. Dieser Materialabschnittsträger 36 setzt sich aus zwei parallel zueinander angeordneten Platten 38 und 40 zusammen, die durch zwei Verbindungselemente 52, z. B. Kopfschrauben, aneinander gepreßt werden. Zwischen diese beiden Platten 38 und 40 sind die Materialabschnitte 34 eingelegt. Durch ein Verspannen der beiden Platten 38 und 40 mit Hilfe der Verbindungselemente 42 werden die Materialabschnitte 34 fixiert.

Der generelle Aufbau der Elektrophoreseeinrichtung gemäß Fig. 4 und 5 entspricht der Ausführungsform gemäß Fig. 3 bis auf eine Abschrägung der zweiten Glasplatte 14' im Bereich zwischen Gelstirnfläche 43 und Glasplattenstirnfläche 45 an der der ersten Glasplatte 12 zugewandten Glasplatteninnenseite. Der Abschrägwinkel α ist in Fig. 5 einge-

zeichnet; die in den Fig. 4 und 5 untere Querkante 47 der Abschrägungsfläche ist in den Fig. 4 und 5 angedeutet. Man erhält auf diese Weise einen keilförmigen Probenzuführbereich 44, was das Einführen der Materialabschnitte 34 des Probenzuführteils 26' erleichtert. Diese Abschrägung der zweiten Glasplatte 14' ist unabhängig von der Ausbildung des Probenzuführteils 26 bzw. 26' und kann daher beispielsweise auch in der Anordnung gemäß Fig. 1 und 2 bzw. Fig. 3 eingesetzt werden.

Die Verwendung einer Vielzahl gesonderter, poröser Materialabschnitte, die in einem Materialabschnittsträger 36 fixiert sind, bringt den Vorteil mit sich, daß der Abstand zwischen und die Anzahl der Materialabschnitte 34 individuell auf verschiedene Probenbedingungen abgestimmt werden können. Auch ist eine Probenmaterialwanderung durch das poröse Material von Materialabschnitt zu Materialabschnitt von vornherein ausgeschlossen.

Es sind auch andere Bauformen des Probenzuführteils 26, 26' denkbar, wie beispielsweise der Einsatz eines Materialabschnittsträgers in Form einer Unterlagsfolie, z. B. in Kammform, die wiederum eine entsprechende Anzahl einzelner Materialabschnitte 34 oder ein ebenfalls kammartiges Blatt aus porösem Material trägt.

Fig. 6 und 7 zeigen eine weitere Ausführungsform der Erfindung, bei der die Elektrophoreseeinrichtung 50 kein durchgehendes ebenes Gel aufweist, sondern eine Vielzahl von gelgefüllten Trennkapillaren 54 innerhalb eines Grundkörpers 52. In die Öffnungen der Trennkapillaren 54 sind die hervorstehenden Abschnitte 62 eines kammartigen Probenzuführteils 56 eingeführt, das entweder, wie dargestellt, als einzelnes Blatt aus porösem Material ausgebildet ist oder, gemäß Fig. 4, 5, von einem Materialabschnittsträger mit einer Vielzahl von gesonderten porösen Materialabschnitten gebildet ist. Das kammartige Probenzuführteil 56 aus porösem Material erleichtert auch hier die Probenzufuhr zu einer Vielzahl von eng benachbarten Probenannahmestellen (hier Öffnungen der Trennkapillaren 54), wenn auch hier die Gefahr des Vermischens von Probenflüssigkeit benachbarter Probenannahmestellen ("übersprechen") von vornherein gering ist. Das Einführen der freien Enden der Abschnitte 62 in die Öffnungen der Trennkapillaren 54 kann durch Zuspitzen oder Abrunden der Abschnitte 62 erleichtert werden oder (in nicht dargestellter Weise analog Fig. 5) durch entsprechendes konisches Aufweiten der Trennkapillarenöffnungen. Vorteilhaft ist bei dieser wie auch bei sämtlichen anderen Ausführungsbeispielen, daß sämtliche Abschnitte 62 ihre Probenflüssigkeit praktisch gleichzeitig an die jeweilige Probenannahmestelle abgeben, so daß die Gefahr, daß bei einigen Proben die Probenflüssigkeit vorzeitig in das Gel diffundiert, wie dies bei sequentieller Probenzuführung, beispielsweise mittels Pipette, der Fall ist, hier nicht besteht. Hinzu kommt, daß in den meisten Fällen die Kapillarkräfte dafür sorgen, daß nur dann Probenflüssigkeit aus dem porösen Material austritt, wenn ein ausreichend großes elektrisches Feld angelegt wird. Schließlich läßt sich auch noch durch Verzögerung der Zugabe von Elektrolyt der Diffusionsbeginn dementsprechend heraus schieben.

Das vorstehend beschriebene kammartige Probenzuführteil in seinen verschiedenen Ausführungsformen aus durchgehend porösem Material oder porösen Materialabschnitten ermöglicht auch eine einfache und rasche Zuführung von Probenflüssigkeit zum Probenzuführteil. Hierzu dient eine in Fig. 8 vereinfacht im Schnitt dargestellte Probengefäßeinheit 66 mit einer Vielzahl von Probenaufnahmen 64. Diese entsprechen in ihrer geometrischen Anordnung der geometrischen Anordnung der hervorstehenden Abschnitte (Zähne) 62 des Probenzuführteils 60. Sind, wie dargestellt, die Zähne linear hintereinander angeordnet, so sind die Pro-

benahmen 64 dementsprechend in linearer Reihe angeordnet. Somit können sämtliche Abschnitte 62 des Probenzuführteils durch entsprechendes Eintauchen in die Aufnahmen 64 gleichzeitig mit Probenflüssigkeit getränkt werden. Nach dem Tränken der Abschnitte 62 wird das Probenzuführteil 60 dann der jeweiligen Elektrophoreseeinrichtung zugeführt. Die Beladung der Probengefäßeinheit 66 kann vorab, z. B. mittels einer entsprechenden manuellen oder automatischen Vielfach-Pipettiereinrichtung, erfolgen, also unabhängig von der eigentlichen Probenbeladung der Elektrophoreseeinrichtung mittels Probenzuführteil 60.

Mit Hilfe des Probenzuführteils mit porösen Abschnitten zum Aufnehmen und Halten von Probenflüssigkeit läßt sich, wie vorstehend erläutert, in einfacher Weise Probenflüssigkeit der jeweiligen Elektrophoreseeinrichtung zuführen, wobei der Abstand benachbarter poröser Abschnitte und damit auch der Abstand der einzelnen Proben voneinander klein gehalten werden kann, was die Meßeffektivität der Elektrophoreseeinrichtung wesentlich erhöht. Gleichzeitiger Start der Wanderung der elektrisch geladenen Bestandteile der Probenflüssigkeit beim Beginn der Elektrophorese ist sichergestellt, so daß die Präzision der Elektrophoresemessungen, insbesondere in bezug auf den Vergleich benachbarter Spuren, hoch ist.

Hiervon unabhängig gibt der Einsatz von porösem Material zur Aufnahme von Probenflüssigkeit auch die Möglichkeit zur Behandlung der Probenflüssigkeit innerhalb des porösen Materials. Das poröse Material dient somit gleichsam als Probengefäß bzw. Reaktionsgefäß. Hierzu kann man das poröse Material nacheinander oder an verschiedenen Stellen des porösen Materials, mit den miteinander in Reaktion zu bringenden Flüssigkeiten tränken, wobei in letzterem Falle eine Vermischung der Flüssigkeiten im porösen Material infolge der Kapillarkräfte erfolgt. Auch ist es möglich, das poröse Material vorab mit mindestens einer der Reaktionsflüssigkeiten zu tränken und zu trocknen, so daß das poröse Material dementsprechend "imprägniert" ist. Zu einem beliebigen späteren Zeitpunkt kann dann das poröse Material in die weitere Reagenzflüssigkeit, z. B. die Probenflüssigkeit oder/und weitere Reagenzlösungen, getaucht werden, um die gewünschte Reaktion ablaufen zu lassen.

Bei der Reaktion kann es sich um eine beliebige biochemische Reaktion handeln, z. B. eine enzymatische Reaktion, eine Nukleinsäure-Hybridisierungsreaktion, eine immunchemische Reaktion oder dergleichen. Bevorzugt werden Reaktionen an Nukleinsäuren durchgeführt, wie etwa eine in vitro-Transkription, wobei ein RNA-Strang durch eine RNA-Polymerase an einer Nukleinsäurematrize erzeugt wird, eine Sequenzierung, wobei vorzugsweise durch enzymatische Reaktionen, z. B. mit T7 DNA-Polymerase, die Nukleotidsequenz einer Nukleinsäure bestimmt wird, oder eine Amplifizierung, wobei durch enzymatische Reaktionen die Menge der in der Probenflüssigkeit vorhandenen Nukleinsäure erhöht werden kann. Ein bevorzugtes Beispiel für eine Amplifizierung ist die PCR (Polymerase-Kettenreaktion). Sie umfaßt drei nacheinander ablaufende Reaktionsschritte, nämlich eine Spaltungsreaktion der DNA in Einzelstränge, eine Hybridisierungsreaktion und eine enzymatische Nukleinsäureelongation. Üblicherweise werden für eine PCR mehrere Zyklen dieser Reaktionsschritte durchgeführt, bevorzugt 20 bis 30 Zyklen, was zu einer hohen Vervielfältigung der gewünschten Nukleinsäure führt. Bevorzugt wird die PCR bei erhöhten Temperaturen durchgeführt, wobei die enzymatische Reaktion bei 65°C bis 80°C, besonders bevorzugt bei 72°C bis 75°C und die Spaltungsreaktion bei 80°C bis 100°C, besonders bevorzugt bei 90°C bis 95°C abläuft. In diesem Fall spricht man auch von Thermocycling mit thermostabilen Enzymen. Durch die PCR oder eine an-

dere Amplifizierungsreaktion kann die Sensitivität der Probenanalyse erheblich gesteigert werden.

Überraschenderweise hält das poröse Material den drastischen Bedingungen beim Thermocycling stand, ohne daß eine die nachfolgende Analyse bzw. Isolierung des Reaktionsprodukts signifikant beeinträchtigende Zersetzung des porösen Materials stattfindet.

Besonders vorteilhaft ist die Kombination des eben beschriebenen Verfahrens mit dem eingangs beschriebenen Verfahren, d. h. daß das poröse Material nach Durchführung der genannten Reaktionen im porösen Material dann einer Probenaufarbeitungseinrichtung, insbesondere Probenanalyseeinrichtung, zugeführt wird, um das Reaktionsergebnis zu untersuchen. In den vorstehend beschriebenen Ausführungsformen wird eine Elektrophoreseeinrichtung eingesetzt. Es ist jedoch auch denkbar, andere Analyseeinrichtungen zu verwenden, wie z. B. Chromatographie-Einrichtungen oder einem Massenspektrographen.

Diese Vorgehensweise soll im folgenden anhand der Fig. 9 erläutert werden.

Fig. 9a zeigt ein kammartiges Probenzuführteil 70 in Form eines Blattes aus porösem Material. Die hervorstehenden Abschnitte 72 des Probenzuführteils werden mit Hilfe einer Dosiervorrichtung 74 mit geeigneten Reagenzien, wie z. B. Farbstoffen, Enzymen, Nukleinsäuren oder dergleichen getränkt. Diese Reagenzien dienen zur Erleichterung der Probenflüssigkeitsanalyse, z. B. durch Farbgebung, Erhöhung der Auflösung oder ähnlichem, oder sie werden zugegeben, um vor der Analyse bestimmte chemische oder biochemische Reaktionen auszulösen oder um bestimmte Probenanteile zurückzuhalten. Dieser Schritt kann auch mehrmals hintereinander mit verschiedenen Reagenzien durchgeführt werden, um somit die porösen Materialabschnitte 72 des Probenzuführteils 60 für eine bestimmte Probenanalyse zu präparieren. Gegebenenfalls wird das Probenzuführteil zwischengelagert, bis die Reagenzien im porösen Material eingetrocknet sind.

In Fig. 9b ist gezeigt, wie die Ausnehmungen 76 einer Probengefäßeinheit 78 jeweils gesondert über eine Pipette 80 mit Probenflüssigkeit befüllt werden. Dieser Schritt kann auch automatisch mit Hilfe einer entsprechenden Vielfach-Pipettier Vorrichtung erfolgen.

Im Anschluß an das Befüllen der Ausnehmung 76 der Probengefäßeinheit 78 wird, wie in Fig. 9c gezeigt, das entsprechende Probenzuführteil 70 aus porösem Material jeweils mit seinen hervorstehenden Abschnitten 72 in die Ausnehmungen 76 der Probengefäßeinheit 78 eingeführt. Dabei saugen sich die Poren des porösen Materials des Probenzuführteils 70 mit Probenflüssigkeit voll (= Probenzugabe). Beim anschließenden Entfernen der hervorstehenden Abschnitte 72 des Probenzuführteils 70 aus den Ausnehmungen 76 bleibt aufgrund der Kapillarkräfte die Probenflüssigkeit in den Poren der jeweiligen Materialabschnitte 72 haften. Somit kann Probenflüssigkeit von der Probengefäßeinheit 78 zur Probenaufarbeitungseinrichtung 82, z. B. Elektrophorese- oder Chromatographieeinrichtung, transportiert werden, wie in Fig. 9d gezeigt.

Die Probenaufarbeitungseinrichtung 82 kann verschiedenen Aufbau aufweisen. So sind alle der bisher beschriebenen Ausführungsformen einsetzbar. Durch eine pH-Werteinstellung und einen wirksamen pH-Puffer wird die Probenflüssigkeit derart aufbereitet, daß die darin enthaltenen Biomoleküle, z. B. Proteine, elektrisch geladen sind. Durch das Anlegen einer ausreichend hohen elektrischen Spannung werden die Kapillarkräfte, die die Probenflüssigkeit im Probenzuführteil 70 halten, überwunden und somit eine Bewegung der geladenen Moleküle entsprechend der auf sie wirkenden elektrischen Kräfte bewirkt. Die Probenflüssig-

keit kann nun bei angelegtem elektrischem Feld entweder durch direkten Kontakt zwischen dem Probenzuführteil 70 und der Gelschicht der Probenbearbeitungseinrichtung 82 in die Gelschicht eintreten oder über eine geeignete Elektrolytlösung, wobei in diesem letzten Fall eine Distanz bis zu einigen Millimetern zwischen Probenzuführteil und Gelschicht liegen kann.

Aufgrund der Empfindlichkeit der üblichen Elektrophoreseeinrichtungen genügt bereits eine geringe Menge an Probenflüssigkeit, mit der die vorstehenden Abschnitte 72 des Probenzuführteils 70 zu tränken sind. Allzu große Mengen an Probenflüssigkeit sind natürlich zu vermeiden, um zu verhindern, daß Probenflüssigkeit über das poröse Material selbst von einem Abschnitt 72 zum nächsten Abschnitt 72 gelangt.

Es hat sich in der Praxis herausgestellt, daß bei diesen relativ geringen Probenmengen zum einen ein "Übersprechen" zwischen den Abschnitten 72 durch Kapillarleitung über das poröse Material von vornherein ausgeschlossen ist. Des weiteren sorgt bei der Elektrophorese das elektrische Feld zuverlässig dafür, daß praktisch die gesamte Probenflüssigkeitsmenge aus dem jeweiligen Abschnitt 72 austritt. Es besteht daher die vorteilhafte Möglichkeit, ein und dasselbe Probenzuführteil 70 auch mehrfach zu verwenden. Dabei können in das gleiche Gel zeitlich nacheinander auch mehrere Probenreihen zugeführt werden, indem das Probenzuführteil 70 in entsprechendem zeitlichen Abstand, jeweils mit neuen Probenflüssigkeiten versehen, der Elektrophoreseeinrichtung zugeführt wird. Aufgrund der zwischenzeitlichen Wanderungen der Probenreihen sind diese verschiedenen Probenreihen örtlich voneinander abgesetzt, d. h. in Richtung des elektrischen Feldes voneinander beabstandet.

Das poröse Material eignet sich darüber hinaus auch zur Weiterleitung von Probenflüssigkeit zu ansonsten nur schlecht zugänglichen Probenannahmestellen. Als Beispiel sei die Probenflüssigkeitszufuhr zu einer Mikrochipanordnung, insbesondere DNA-Sensor-Anordnung erwähnt, wie diese stark vereinfacht, in Fig. 10 angedeutet ist.

Auf einem Träger 90 befinden sich verschiedene Sensorbereiche 92, denen aufgrund ihrer geringen Größe (z. B. 2 mm x 2 mm) nur sehr schwer direkt Probenflüssigkeit zugeführt werden kann. Mit Hilfe von gesonderten Probenzuführteilen 94 aus porösem Material kann jedoch sehr leicht eine Probenzufuhr erfolgen. Durch Zugabe von Probenflüssigkeit mit Hilfe einer Pipette 96 in verhältnismäßig großflächigen Bereichen der porösen Probenzuführteile 94 mit anschließendem Wandern der Probenflüssigkeit im porösen Material aufgrund der Kapillarkräfte zu den Mikrobereichen hin kann gezielt eine Probenflüssigkeitszufuhr erreicht werden.

Anstelle der dargestellten sternförmigen Anordnung der gesonderten Probenzuführteile 94, kann auch eine beliebige andere geometrische Anordnung gewählt werden, wie z. B. parallel nebeneinander, vorzugsweise mit von Probenzuführteil zu Probenzuführteil variierender Zuführteillänge. Auf diese Weise kann der Abstand zwischen den Zugabeenden der Probenzuführteile vergrößert werden. Auch bei diesen Anordnungen kann die Weiterleitung des Probenmaterials vom Probenzuführteil zum jeweiligen Sensorbereich durch ein entsprechendes elektrisches Feld erzwungen werden.

In Fig. 11 ist eine weitere Elektrophoreseeinrichtung 100 vereinfacht dargestellt, aus einer unteren Glasplatte 102, einer oberen Glasplatte 104 und einer dazwischenliegenden Gelschicht 106, wobei sich die Gelschicht 106 hier bis zum linken unteren Ende der oberen Glasplatte 104 erstreckt. Dies vereinfacht die Gelherstellung. Zudem gibt dies die Möglichkeit, die ebenfalls kammartigen Probenzuführteile 108 im wesentlichen senkrecht zur (hier horizontalen) Ebene der Gelschicht 106 anzuordnen. Die Elektrophoreseeinrichtung 100 kann, ebenso wie die vorstehend beschriebenen Elektrophoreseeinrichtungen, auch in beliebig anderer Raumorientierung betrieben werden, da hier nicht, wie bei bekannten Elektrophoreseeinrichtungen mit Probenaufnahmetaschen am Gelrand, die Gefahr besteht, daß das Probenmaterial ausfließt. Das poröse Material hält, wie mehrfach angesprochen, das Probenmaterial aufgrund von Kapillarkräften in sich; erst das elektrische Feld sorgt für eine gerichtete Wanderung des Probenmaterials in das Gel.

Um das kammförmige Probenzuführteil 108 in der dargestellten Position in Anlage an der Stirnfläche 110 der oberen (vergleichsweise kürzeren) Glasplatte 104 zu halten, kann, wie dargestellt, eine Stützleiste 112 eingesetzt werden mit Bildung eines der Dicke des Probenzuführteils 108 im wesentlichen entsprechenden Spalts zwischen sich und der Stirnfläche 110. Auf diese Weise werden die mit dem Probenmaterial beladenen Enden der Materialabschnitte ("Zähne") 114 des Probenzuführteils 108 entweder unmittelbar an der entsprechenden Stirnfläche 116 der Gelschicht 106 gehalten oder in geringem Abstand hierzu. Nach Zuführen von Elektrolyt und Einschalten des elektrischen Feldes erfolgt dann die gewünschte gerichtete Wanderung des Probenmaterials aus dem Probenzuführteil 108 in die Gelschicht 106 (= Probenannahme). Da die Zähne des Probenzuführteils 108 nicht mehr zwischen die beiden eng benachbarten Glasscheiben 104 und 106 eingefädelt werden müssen, vereinfacht sich die Handhabung wiederum.

Zum generellen Aufbau der vorstehend beschriebenen Elektrophoreseeinrichtungen sei noch ergänzt, daß das elektrische Feld in üblicher Weise aufgebaut wird durch Ausbilden einer Kathode bzw. Anode im Bereich der beiden Endbereiche der Gelschicht.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Zuführung von Probenmaterial mittels eines Probenzuführteils von einer Probenzugabestelle zu einer Probenannahmestelle einer Probenbearbeitungseinrichtung, vorzugsweise Probenanalyseeinrichtung, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Probenzuführteil wenigstens einen Materialabschnitt aus porösem Material aufweist mit einer derartigen Porengröße des porösen Materials, daß das Probenmaterial zumindest bei der Probenzugabe in das Probenzuführteil und bei der Probenannahme durch die Probenbearbeitungseinrichtung im porösen Material in flüssiger Phase aufgrund von Kapillarkräften gehalten wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das Probenmaterial nach Probenzugabe in das Probenzuführteil trocknet und daß man das Probenzuführteil vor der Probenabgabe einer flüssigen Phase zuführt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man im Bereich der Probenannahmestelle ein den porösen Materialabschnitt durchsetzendes elektrisches Feld erzeugt, um einen Fluß elektrisch geladener Moleküle, Makromoleküle oder Teilchen des Probenmaterials vom porösen Materialabschnitt in die Probenbearbeitungseinrichtung zu bewirken.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man nach der Zugabe der Probe das Probenzuführteil von der Probenzugabestelle zur Probenannahmestelle transportiert.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß der poröse Materialabschnitt des Probenzuführteils die Probenzugabestelle

mit der Probenannahmestelle körperlich verbindet (Fig. 10).

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man bei einer Probenbearbeitungseinrichtung mit einer Vielzahl von Probenannahmestellen eine entsprechende Vielzahl poröser Materialabschnitte einsetzt.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Probenzuführteil einen Materialabschnittsträger umfaßt, welcher die Materialabschnitte in einer der geometrischen Anordnung der Probenannahmestellen entsprechenden Anordnung trägt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Probenzuführteil bei einer linearen oder bogenförmigen Anordnung der Probenannahmestellen im wesentlichen kammartig geformt ist.

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Probenzuführteil ein sämtliche poröse Materialabschnitte aufweisendes Blatt aus porösem Material umfaßt.

10. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Materialabschnittsträger eine entsprechende Vielzahl gesonderter Materialabschnitte trägt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Materialabschnittsträger von einer Unterlagsfolie gebildet ist.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man poröses Material mit einer mittleren Porengröße unter 100 µm, vorzugsweise unter 10 µm, am besten unter 1 µm einsetzt.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man poröses Material mit einer mittleren Porengröße zwischen 1,5 µm und 0,2 µm, am besten bei etwa 0,5 µm einsetzt.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man poröses Material aus porösem Celluloseacetat oder porösem Polyethylen oder porösem Glas oder Agarosegel oder anderen weitmäschigen Gel-Matrizen einsetzt.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man den pH-Wert der flüssigen Phase derart einstellt, daß biologische Makromoleküle in der Probenflüssigkeit elektrisch geladen sind.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man das Probenzuführteil mehrmals hintereinander zur Zuführung von Probenflüssigkeit einsetzt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Probengefäßseinheit einsetzt mit einer Vielzahl von Probenaufnahmen in einer der geometrischen Anordnung der Materialabschnitte des Probenzuführteils entsprechenden geometrischen Anordnung.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man das Verfahren zur Zuführung von Probenflüssigkeit zu einer Elektrophoreseeinrichtung oder einer Chromatographieeinrichtung einsetzt.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrophoreseeinrichtung ein horizontal oder vertikal orientiertes Trennmittel, vorzugsweise Trenngel, aufweist.

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man eine flüssige Phase, vorzugsweise Pufferlösung, in einen Be-

reich an einem Zugabeende eines Trennmittels der Elektrophoreseeinrichtung bzw. Chromatographieeinrichtung zugibt und zwar vor oder nach dem Heranführen des Probenzuführteils.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen dem wenigstens einen porösen Materialabschnitt des herangeführten Probenzuführteils und dem Zugabeende des Trennmittels kein Abstand oder ein Abstand bis zu mehreren Millimetern besteht.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß bei einem zur gleichzeitigen Trennung mehrerer Probenflüssigkeiten geeigneten Trennmittel mit mehreren Probenflüssigkeit-Zugabestellen längs einer Trennmittelkante an den Probenflüssigkeit-Zugabestellen im Trennmittel Probenflüssigkeit-Ausnehmungen ausbilden zur Aufnahme entsprechender poröser Materialabschnitte des Probenzuführteils (Fig. 1, 2).

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß man die Probenflüssigkeit-Ausnehmungen unabhängig vom Probenzuführteil und vor Zuführen des Probenzuführteils herstellt oder durch Einsetzen des bereits mit Probenmaterials versehenen kammförmigen Probenzuführteils in das Trenngel-Material vor dessen Polymerisierung.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß bei einem zur gleichzeitigen Trennung mehrerer Probenflüssigkeiten geeigneten Trennmittel mit mehreren Probenzugabestellen längs der Trennmittelkante das Probenzuführteil mit seinen voneinander in Richtung der Trennmittelkante beabstandeten Materialabschnitten in Kontakt mit der Trennmittelkante bringt oder in einem bis zu einigen Millimetern Abstand von der Kante anzuordnen. (Fig. 3 bis 5).

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Materialabschnitte im wesentlichen in einer zur Ebene des Trennmittels gemeinsamen Fläche angeordnet sind, welche Fläche entweder in der Ebene des Trennmittels liegt oder senkrecht zu dieser angeordnet ist.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß man das Verfahren zur Zuführung von Probenflüssigkeit zu einer mehrere Trennkapillaren aufweisenden Elektrophoreseeinrichtung oder Chromatographieeinrichtung einsetzt.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß man das Verfahren zur Zuführung von Probenflüssigkeit zu einer mehrere Sensoren, vorzugsweise DNA-Sensoren, aufweisenden Mikrochipanordnung einsetzt.

28. Probenzuführteil zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche mit wenigstens einem Materialabschnitt aus porösem Material.

29. Elektrophoreseeinrichtung mit Probenzuführteil zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 28.

30. Verfahren zur Durchführung einer Reaktion zwischen mindestens einem ersten und mindestens einem zweiten Reaktionspartner, vorzugsweise zum Nachweis oder/und zur Herstellung eines biochemischen Reaktionsprodukts in einer Probenflüssigkeit, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens einen ersten Reaktionspartner, der auf einem porösen Material reversibel adsorbiert ist, in einer flüssigen Phase in Kontakt mit mindestens einem zweiten Reaktionspartner bringt, wobei die Porengröße des porösen Materials derart ist,

- daß die flüssige Phase zumindest teilweise im porösen Material aufgrund von Kapillarkräften gehalten wird.
31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Reaktionspartner trocken auf dem porösen Material adsorbiert ist. 5
32. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der durchgeführten Reaktion um eine Nachweisreaktion zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe biologischen Ursprungs handelt. 10
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe eine Körperflüssigkeit umfaßt.
34. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 oder 33, dadurch gekennzeichnet, daß es sich beim ersten Reaktionspartner um eine mit dem Analyten spezifisch bindefähige Substanz oder um eine mit dem Analyten um einen Bindepartner konkurrierende Substanz handelt. 15
35. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Reaktion eine Markierungsgruppe vorhanden ist, die das Auftreten und/oder die Stärke der Reaktion anzeigt. 20
36. Verfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine nichtradioaktive Markierungsgruppe handelt. 25
37. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Reaktion um eine Reaktion an Nukleinsäuren, z. B. eine in vitro-Transkription, eine Sequenzierung oder eine Amplifizierung handelt. 30
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionsprodukte im wesentlichen vollständig in den Poren gehalten werden.
39. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionsprodukte im wesentlichen vollständig aus dem porösen Material entfernbar sind. 35
40. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß man die das Reaktionsprodukt enthaltende Probeflüssigkeit gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 26 einer Probenbearbeitungseinrichtung, vorzugsweise Probenanalyseeinrichtung, zuführt. 40
41. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß man nach Ablauf der gewünschten Reaktionsdauer kein nichtwäßriges Stop- oder/und Denaturierungsreagenz zugibt. 45
42. Reagenz zur Durchführung einer Reaktion, insbesondere zum Nachweis oder/und zur Herstellung eines biochemischen Reaktionsprodukts, umfassend ein Teil mit wenigstens einem Materialabschnitt aus porösem Material, wobei mindestens eine reaktive Substanz auf dem porösen Material reversibel adsorbiert ist, wobei die Porengröße des porösen Materials derart ist und 50
daß die reaktive Substanz bei Kontakt mit Flüssigkeit zumindest teilweise im porösen Material aufgrund von Kapillarkräften gehalten wird. 55
43. Reagenzienkit zur Durchführung einer Reaktion, insbesondere zum Nachweis oder/und zur Herstellung eines biochemischen Reaktionsprodukts, umfassend mindestens ein Reagenz nach Anspruch 42. 60

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

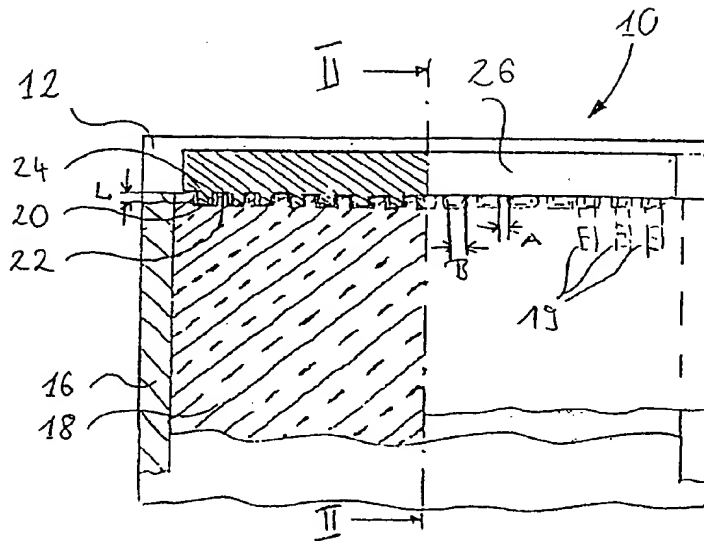


Fig. 1

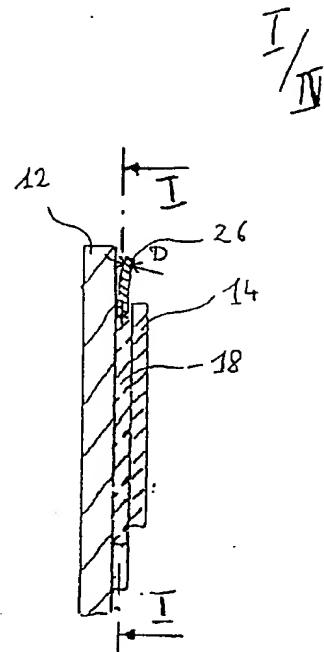


Fig. 2

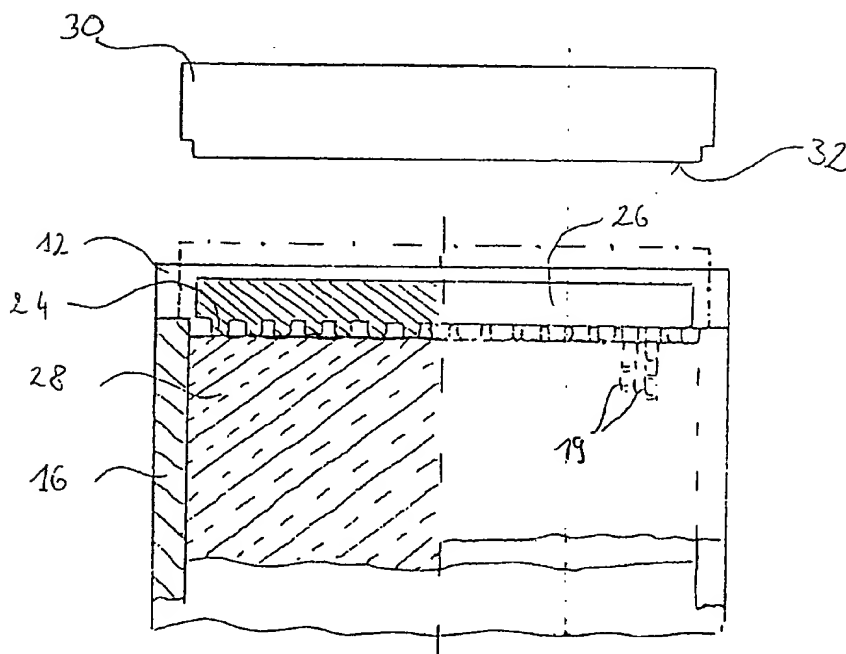
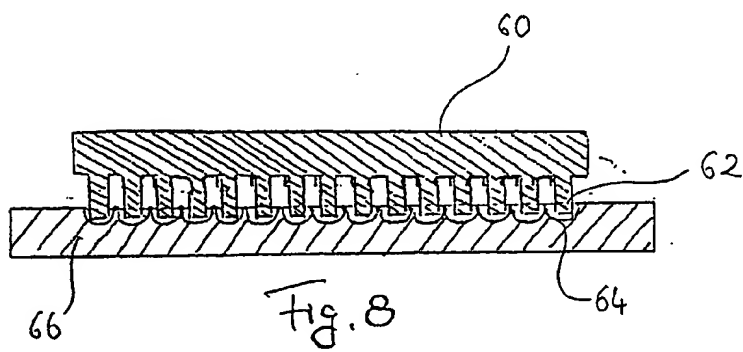
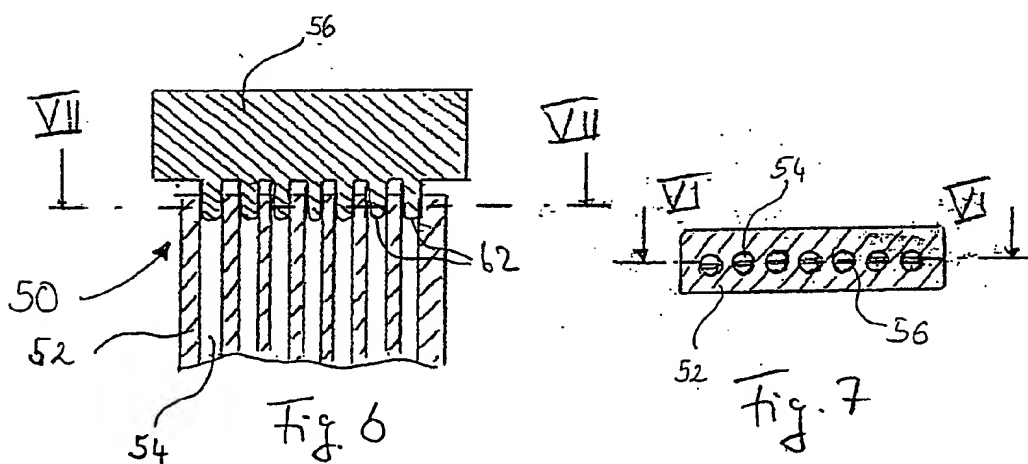
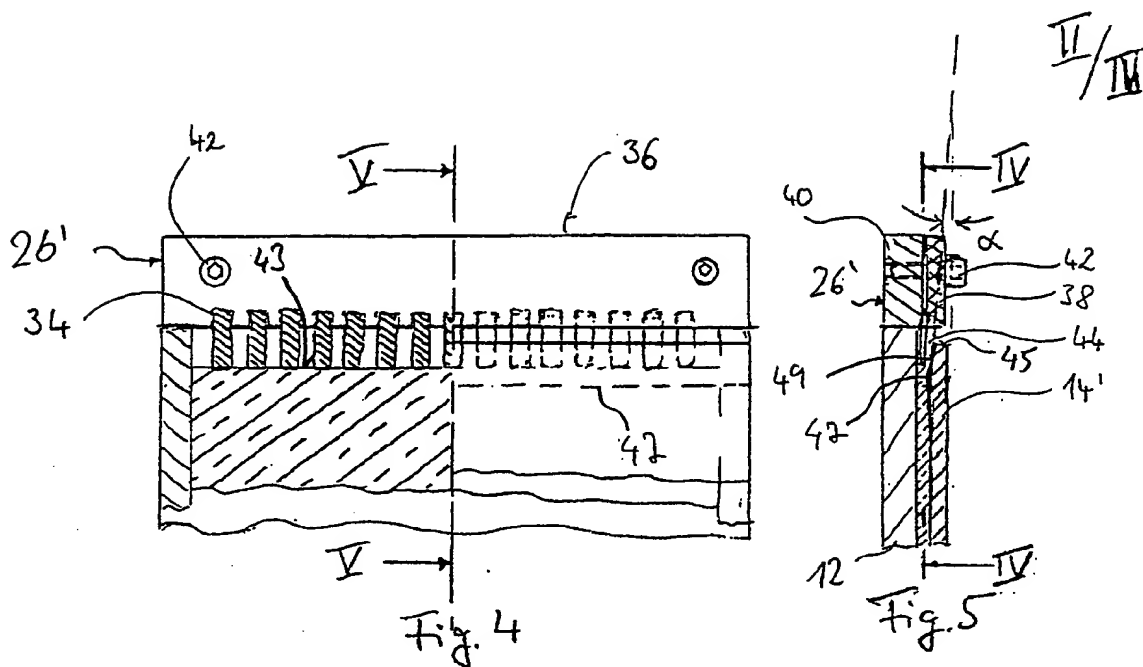


Fig. 3



III/
IV

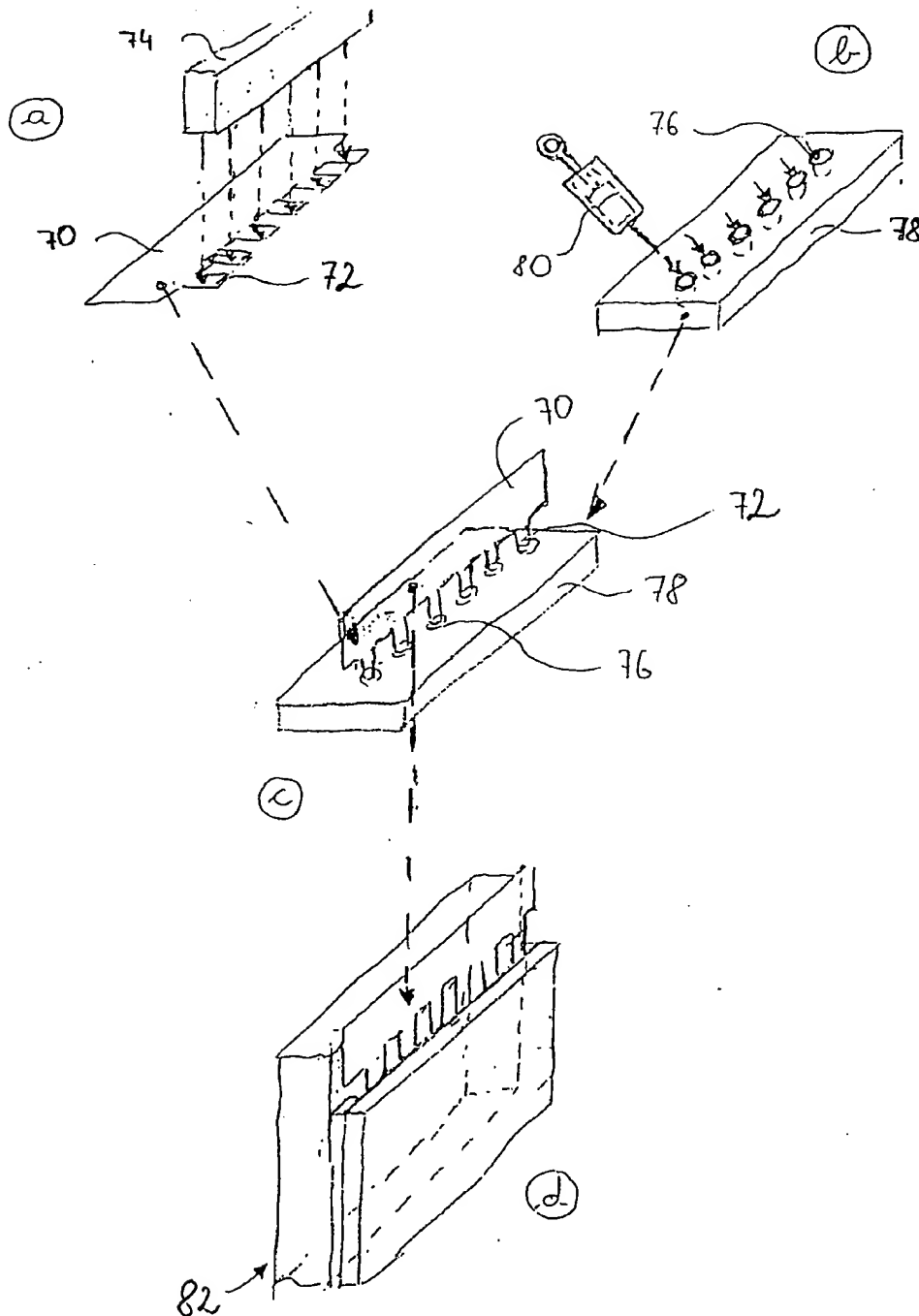


Fig. 9

IV
/ II

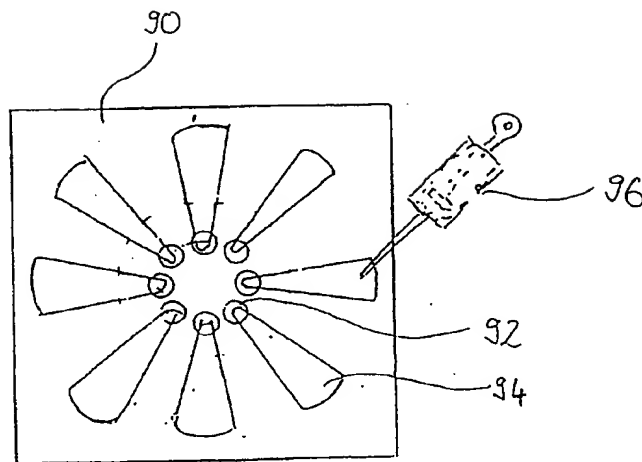


Fig. 10

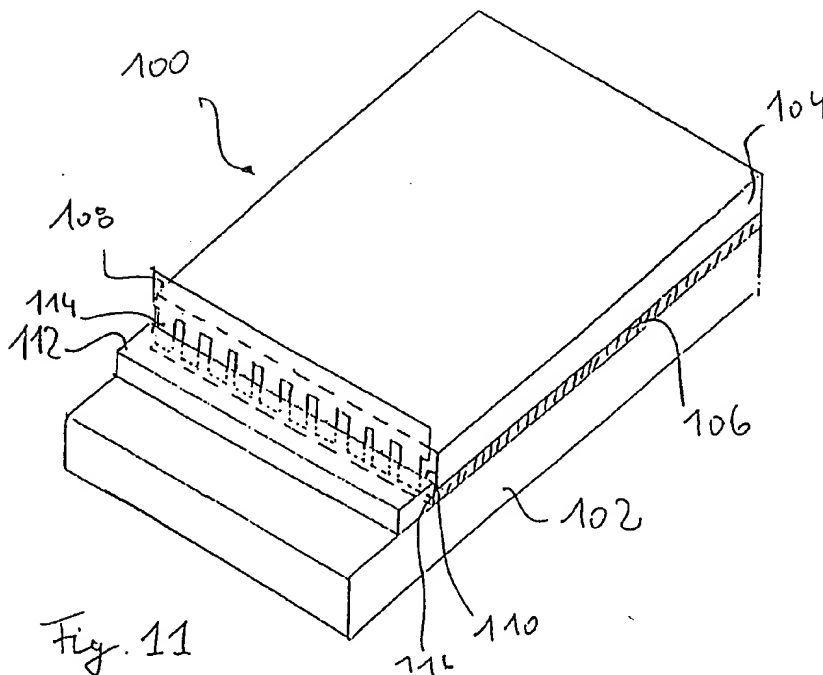


Fig. 11